

مکان‌یابی آنزیم Na^+, K^+ -ATPase و سلول‌های یونوسیت در آبشش گربه ماهی *Silurus glanis* به روش ایمونوهیستوشیمی

صابر خدا بنده^۱ Ph.D.، زهرا تقی‌زاده^۱ M.Sc.

۱. دانشگاه تربیت مدرس، نور، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، گروه بیولوژی دریا
✉ آدرس مکاتبه: نور، صندوق پستی: ۴۶۴۱۴-۳۵۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، گروه بیولوژی دریا

پست الکترونیکی: surp78@yahoo.com Email:

چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۱۱/۲، پذیرش مقاله: ۸۵/۲/۲

*** هدف:** تعیین محل حضور سلول‌های یونوسیت و آنزیم Na^+, K^+ -ATPase در آبشش گربه ماهی اسبله (*S. glanis*)
*** مواد و روش‌ها:** نمونه‌ها در محلول بوئن فیکس و پس از مراحل آب‌گیری در داخل پارافین قالب‌گیری و برش داده شدند. برای بررسی‌های بافت‌شناسی، برش‌ها با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری مطالعه شدند. برای مطالعه ایمونوهیستوشیمی از آنتی‌بادی (Mouse Monoclonal Antibody Raised Against the α -subunit of the Chicken Na^+, K^+ -ATPase) IgG α_5 و آنتی‌بادی (FITC (Monoclonal Mouse Anti-fluorescein Antibody) پس از طی مراحل آماده‌سازی مشاهده سلول‌های یونوسیت به کمک میکروسکوپ نوری فلوروسانس با فیلترهای ۴۹۰-۴۵۰ نانومتر انجام شد.
*** یافته‌ها:** در برش طولی دو ردیف تیغه‌های آبششی مشاهده می‌شود. رشته‌ها و تیغه‌های آبششی توسط بافت پوششی تخصص یافته‌ای پوشیده شده است. این بافت پوششی دارای سلول‌های همراه، سلول‌های موکوسی و سلول‌های یونوسیت است. در روش ایمونوهیستوشیمی، آنتی‌بادی IgG α_5 روی آنزیم Na^+, K^+ -ATPase قرار گرفته و با حضور آنتی‌بادی FITC این آنزیم را به صورت فلوروسانس نشان می‌دهد. هیچ سلول ایمونوفلوروسانسی روی تیغه‌های آبششی دیده نشد ولی تعدادی سلول ایمونوفلوروسانس روی رشته‌های آبششی درست در فضاهای بین تیغه‌ای دیده شدند. تعدادی از این سلول‌های ایمونوفلوروسانس نیز در ناحیه رأسی رشته‌های آبششی مشاهده شدند. با بزرگ‌نمایی بیشتر مشاهده شد این سلول‌ها کروی و در ناحیه قاعده‌ای-جانبی خود دارای فلوروسانس قوی هستند.
*** نتیجه‌گیری:** در گربه ماهی اسبله، سلول‌های یونوسیت در فضاهای بین پایه‌ای تیغه‌های آبششی و در ناحیه رأسی رشته آبششی حضور دارند. آنزیم Na^+, K^+ -ATPase با تراکم قابل ملاحظه‌ای در ناحیه قاعده‌ای-جانبی این سلول‌ها قرار داشته و مبین شرکت فعال این سلول‌ها در مکانسیم تنظیم اسمزی است.

کلید واژگان: Na^+, K^+ -ATPase، یونوسیت، *Silurus glanis*، تنظیم اسمزی، ایمونوهیستوشیمی

فصلنامه پزشکی باخته، سال هشتم، شماره ۱، بهار ۸۵، صفحات ۵۲-۴۵

مقدمه

آب‌طوری تعبیه شده که حداقل نفوذپذیری را نسبت به آب داشته باشند. این ماهی‌ها آب نمی‌نوشند و سطوح تنفسی آنها برای تبادلات گازی مطلوب، نازک و وسیع است (۲، ۳) و معمولاً بیشترین مقدار مواد محلول را از دست می‌دهند و آب را غیرارادی جذب می‌کنند. پس ماهی‌ها به بافت‌ها و سلول‌های خاصی برای بازگرداندن یون‌های از دست رفته و خروج آب اضافی نیاز دارند. آبشش‌ها نقش بسیار مهمی در ثابت نگه داشتن ترکیب یونی درون بدن در مواجهه با محیط‌های هیپراسموتیک و هیپواسموتیک دارند (۲). ساختار آبشش ماهی‌های استخوانی به عنوان عضو فعال در انتشار گازهای تنفسی، تنظیم یونی و دفع مواد زائد به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (۷-۲). امروزه سلول‌های یونوسیت (سلول‌های کلراید: سلول‌های غنی از میتوکندری) به عنوان مکان‌هایی برای خروج Na^+ و Cl^- در ماهی‌های آب دریا و به عنوان مسئول جذب فعال یون (خصوصاً سدیم) در گونه‌های آب شیرین شناخته می‌شوند (۲، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۲۲). تحقیقات بر روی گربه ماهی Armored در برزیل نشان داده

گربه ماهیان از خانواده سیلوریده (Siluridae) در آب‌های شیرین رودخانه‌های بزرگ و دریاچه‌های دارای بستر نرم و گاه آب‌های لب شور دیده می‌شوند. این ماهی‌ها در اکثر کشورها جزء ماهیان مهم پرورشی محسوب می‌شوند و به دلیل داشتن گوشت سفید فاقد استخوان و کم‌چرب، ارزش اقتصادی بالایی دارند. در ایران دو گونه از این خانواده گزارش شده است که گونه *S. glanis* با نام اسبله در ایران در طول خط ساحلی دریای خزر، رودخانه ارس، مرداب انزلی، سد منجیل و سد مهاباد یافت می‌شود (۱) و در حال حاضر فیله آن جهت مصرف در بازار به فروش می‌رسد. اسبله ماهی، ساکن آب شیرین و نسبت به محیط خود دارای حالت هیپراسموتیک است (اسمولاریته خون ۳۵۰-۳۰۰ میلی اسمول بر کیلو در مقابل ماکزیمم ۵ میلی اسمول بر کیلو آب شیرین) (۲، ۳). در چنین شرایطی ماهی با مشکل هجوم آب به درون بدن و خروج یون‌ها روبرو است. در ماهی‌های آب شیرین برای مقابله با این مشکل سطوح تماس با

سپس سه نوبت ۴ ساعته داخل پارافین مایع واقع در اون قرار گرفت و در پایان در پارافین قالب گیری شدند (۸، ۱۸).

از قالب‌ها، به وسیله میکروتوم، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و روی لام‌های با پوشش Poly-L-Lysin قرار داده شدند. برای مطالعه ساختار بافت‌شناسی آبتش‌ها، لام‌ها به وسیله هماتوکسلین و اتوزین رنگ آمیزی و توسط میکروسکوپ نوری مطالعه شدند.

تعیین مکان حضور آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ با استفاده از آنتی‌بادی $\text{IgG}\alpha_5$:

Monoclonal Antibody Raised Against the α -subunit of the Chicken $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$; Developmental (Studies Hybridoma Bank, The University of Iowa, USA)

و آنتی‌بادی FITC:

Mouse Anti-fluorescein Antibody (Jackson Immuno Research, USA)

و میکروسکوپ نوری فلئورسانس انجام گرفت.

برای مطالعه ایمنو‌هیستوشیمی، لام‌ها بعد از پارافین زدایی در (Histochoice Clearing Agent: HCA) و آب‌دهی در الکل اتانول به ترتیب ۱ دقیقه در محلول (Phosphate Buffered Saline: PBS)، ۱۰ دقیقه در محلول A (۴۰۰ سی سی PBS ۱۰ میلی مول + ۳/۵ گرم کلرید سدیم) و ۲ دقیقه در محلول B (۵۰ درصد PBS و ۵۰ درصد Regiler که نوعی شیر خشک است) قرار داده شدند (۸، ۹، ۱۲). سپس لام‌ها به مدت ۲ دقیقه در PBS شستشو داده شد و داخل یک جعبه حاوی هوای مرطوب، به طوری که سطح دارای برش به طرف بالا باشد، چیده شد. بر روی هر لام ۲-۳ قطره از آنتی‌بادی $\text{IgG}\alpha_5$ رقیق شده (۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی با ۹۰۰ میکرولیتر BS در یک میلی لیتر محلول) به میزان ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر برای ۱۰ لام در PBS اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. بعد از شستشوی آنتی‌بادی اضافی با PBS، ۳-۲ قطره از آنتی‌بادی FITC (۵ میکرولیتر FITC به علاوه ۹۹۵ میکرولیتر PBS در یک میلی لیتر محلول) روی هر لام اضافه و به مدت یک ساعت در محیط کاملاً تاریک نگه داشته شد. سپس لام‌ها با PBS شستشو و با استفاده از مایع مونتاژ، مونتاژ شدند.

برای پی‌بردن به درستی کارکرد این آنتی‌بادی به صورت یک در میان به تعدادی از لام‌ها آنتی‌بادی $\text{IgG}\alpha_5$ اضافه نشد اما آنتی‌بادی FITC به لام‌های شاهد منفی اضافه شد تا این لام‌ها با فلئورسانس نشدن متمایز شوند. کلیه لام‌ها بعد از قرار دادن لامل روی آنها در جعبه‌های مخصوص چیده و برای حفظ خواص فلئورسانسی در جای کاملاً تاریک نگهداری شد. لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری فلورسانس (Leitz Diaplan Coupled to a Ploemopak 1- Lambda Lamp) با فیلترهای ۴۹۰-۴۵۰ نانومتر مشاهده و عکس برداری شد.

یافته‌ها

مشاهدات بافت‌شناسی نشان داد که در گربه ماهی *S. glanis* هر

است که در آب‌های فقیر از نظر یون، سلول‌های یونوسیت روی تیغه‌ها و رشته‌های آبتشی این ماهی حضور دارد (۴).

یکی از مکانیسم‌های بسیار مهم انتقال فعال، پمپ سدیم - پتاسیم است. این پمپ یون‌های سدیم را به بیرون از غشای سلول می‌راند و یون‌های پتاسیم را به درون غشا پمپ می‌کند. پروتیین حامل این پمپ از دو پروتیین مجزای گلوبولی تشکیل شده است. وزن پروتیین بزرگتر موسوم به زیر واحد α تقریباً دو برابر وزن پروتیین کوچکتر یعنی زیر واحد β می‌باشد. پروتیین β کمپلکس پروتیین را در غشا چربی نگه می‌دارد و پروتیین α دارای گیرنده‌های سدیم و پتاسیم است و قسمتی از درون آن فعالیت ATPase دارد ($\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$). این پمپ معمولاً در تمام سلول‌ها وجود دارد ولی تراکم آن در سلول‌های دخیل در تنظیم یونی (مانند سلول‌های یونوسیت) خیلی بیشتر است (۱۵).

تحقیقات نشان داده است آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ نقش محوری در انتقال یونی سلول‌های یونوسیت ایفا می‌کند. پروتیین α دارای واکنش‌پذیری ایمنیایی (Immunoreactivity) است و ثابت شده است که شدت این واکنش با فعالیت آنزیم مرتبط است (۱۶). اخیراً از آنتی‌بادی $\text{IgG}\alpha_5$ جهت مکان‌یابی سلول‌های یونوسیت و در واقع برای تعیین مکان‌های حضور آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در حد وسیعی استفاده شده است (۷، ۸، ۹، ۱۲، ۱۴، ۱۷).

با وجود مطالعات فراوان روی سلول‌های یونوسیت ماهی‌های مختلف و خصوصاً آزاد ماهیان، مطالعه‌ای روی پراکنش، ساختار و عمل سلول‌های یونوسیت و همچنین آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در آبتش گربه ماهیان سیلوریده انجام نگرفته است. شناخت ساختار و مکانیزم اندام‌های تنظیم اسمزی آبزیان می‌تواند نقش موثری در انتخاب آنها برای پرورش در آب‌های مختلف داشته باشد. نظر به اینکه گربه ماهی *S. glanis* ماهی آب‌های شیرین است و به ندرت وارد مصب‌ها می‌شود، شناخت ساختار آبتشی و پراکندگی سلول‌های یونوسیت آن موضوع این تحقیق قرار گرفته است.

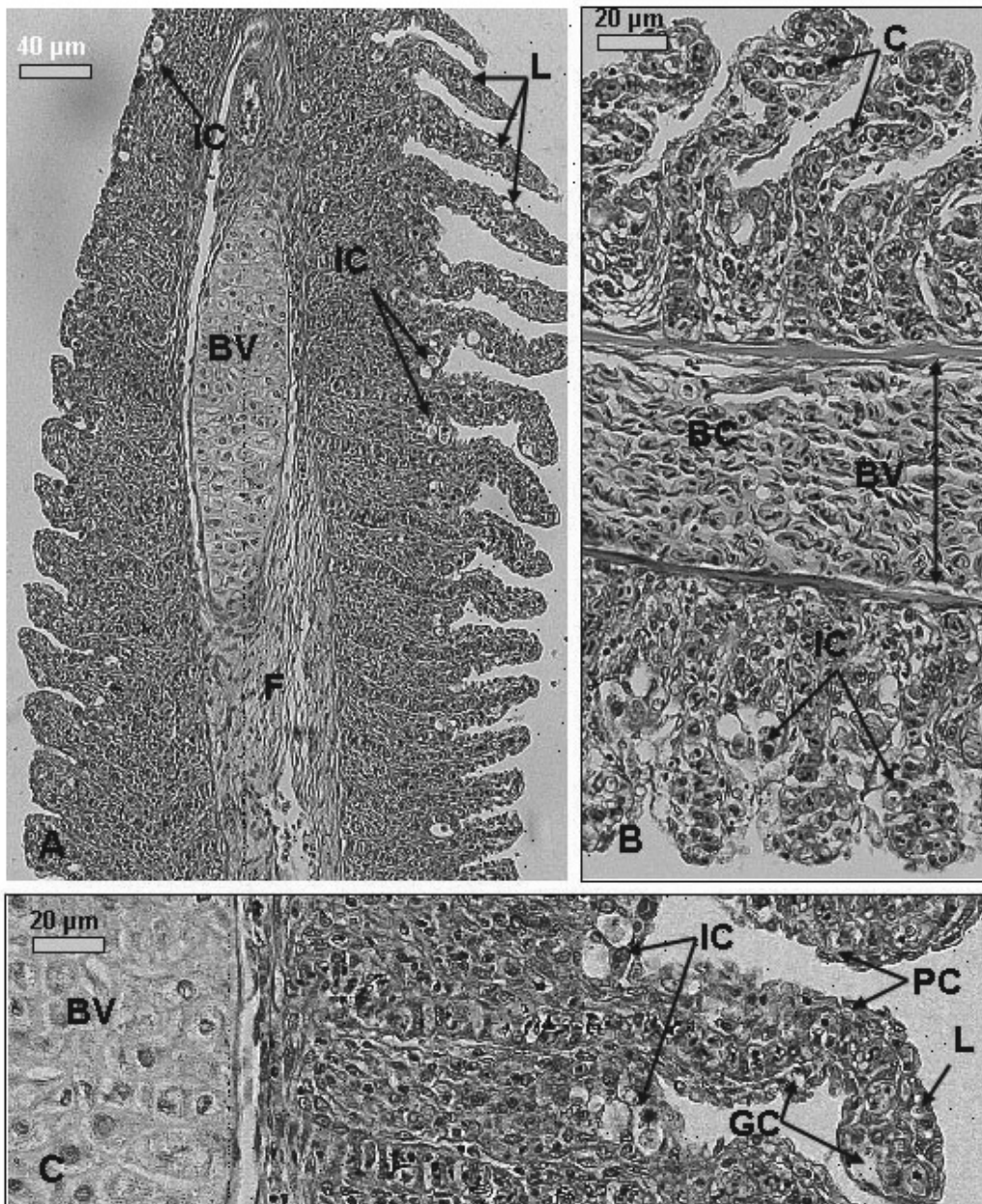
در این تحقیق از آنتی‌بادی $\text{IgG}\alpha_5$ برای مکان‌یابی سلول‌های یونوسیت و همچنین تعیین محل حضور آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در آبتش ماهی *S. glanis* استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۰ عدد گربه ماهی یک ساله به طول استاندارد متوسط $20 \pm 1/4$ سانتی متر و به وزن 300 ± 15 گرم در خرداد ماه سال ۱۳۸۳ از سد مهاباد صید و قسمتی از آبتش‌ها (یک سانتی متر مکعب) بلافاصله پس از صید جدا و در محلول بوئن فیکس شد. نمونه‌ها بعد از ۲۴ ساعت از محلول بوئن خارج و در الکل اتانول ۷۰ درصد قرار گرفت. برای از بین بردن بقایای رنگ زرد بوئن از روی آبتش‌ها، نمونه‌ها چندین نوبت در الکل اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شدند. بعد از بیست روز نمونه‌ها از الکل ۷۰ درصد خارج و برای آب‌گیری به ترتیب در الکل ۹۰ درصد (یک ساعت) الکل ۹۵ درصد (یک ساعت) الکل ۱۰۰ درصد (یک ساعت) و نهایتاً در الکل بوتانل (۱۲ ساعت) قرار داده شدند. نمونه‌ها

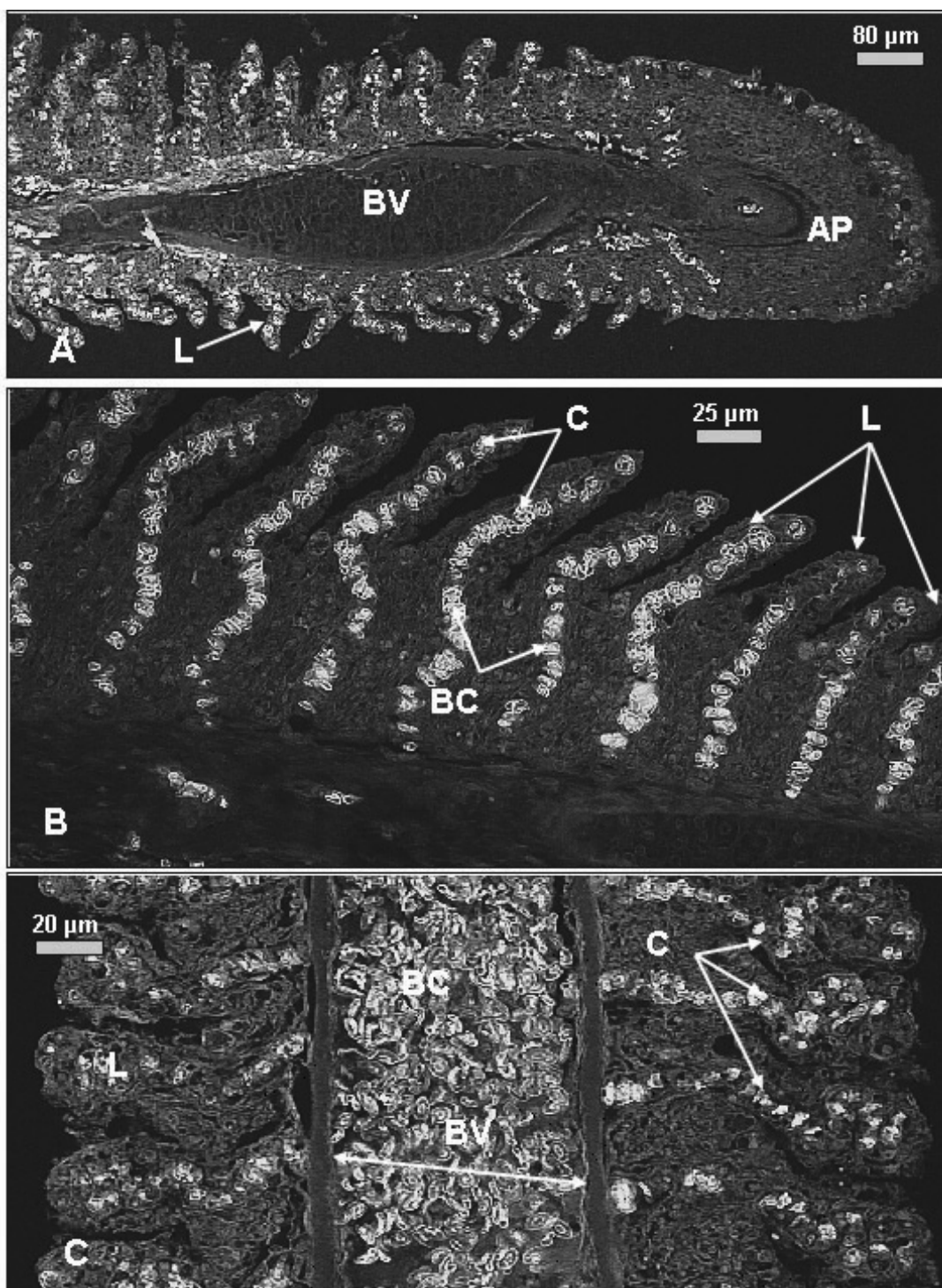
ارتفاع متوسط ۱۰۰ میکرومتر به صورت دو ردیف عمود بر محور طولی رشته قرار گرفته‌اند (شکل ۱A و ۱B). بخش انتهایی یا نوک رشته فاقد تیغه است (شکل ۱A و ۱B).

کمان برانشی (Arch) از دو ردیف رشته‌های ظریف برانشی (Filament) پوشیده شده است و بر روی هر رشته برانشی تعدادی صفحات نازک و پهن موسوم به تیغه‌های آبششی (Lamellae) با



شکل ۱: (A) برش طولی رشته آبششی (فیلامنت). تیغه‌های آبششی (لاملاها) در دو سمت رشته به خوبی قابل رویت هستند. در محور میانی رشته، بخشی از رگ خونی محتوی سلول‌های خونی مشاهده می‌شود. سلول‌های یونوسیت در ناحیه بین تیغه‌ای (Interlamellar) قرار دارند. (B) قسمتی از رشته و تیغه‌ها در دو سمت آن. مویرگ‌های حامل سلول‌های خونی در امتداد تیغه‌ها به خوبی قابل مشاهده هستند. رگ خونی میانی رشته، بخش وسیعی از بافت رشته آبششی را در بر گرفته است. (C) سلول‌های یونوسیت با رنگ روشن، اندازه درشت و شکل کروی در ناحیه بین تیغه‌ای قرار دارند. در ناحیه بین تیغه‌ای تجمعی از سلول‌های مختلف همچون سلول‌های سنگفرشی و جامی (Goblet cells) دیده می‌شود.
 BV: Blood vessel؛ BC: blood cell؛ AP: Apical part of filament؛ IC: Ionocyte cell؛ GC: Goblet cell؛ F: Filament؛ C: Capillary؛ L: Lamella؛ N: Nucleus؛ PC: Pavement cell؛ N: هسته سلول؛ GC: سلول جامی؛ IC: سلول یونوسیت؛ BV: رگ خونی؛ تیغه آبششی؛ N: هسته سلول؛ PC: سلول سنگفرشی

(نمونه رنگی شکل در انتهای مقالات)



شکل ۲: (A) برش طولی رشته آبششی (نمونه شاهد). همان‌طور که مشاهده می‌شود هیچ گونه فلئورسانسی دیده نمی‌شود. (B) برش طولی رشته و تیغه‌های آن (نمونه شاهد). در این تصویر مویرگ‌های درون تیغه‌ها به خوبی مشخص‌اند و فلئورسانسی دیده نمی‌شود. (C) قسمتی از برش طولی رشته (نمونه شاهد). تیغه‌ها، مویرگ‌ها و سلول‌های خونی به خوبی مشخص هستند و فلئورسانسی دیده نمی‌شود.

C: Capillary; **BV: Blood vessel**; **BC: blood cell**; **AP: Apical part of filament**; **F: Filament**; **L: Lamella**; **IC: Ionocyte cell**; **GC: Goblet cell**; **N: Nucleus**; **PC: Pavement cell**; **N: هسته سلول**; **سلول سنگفرشی**

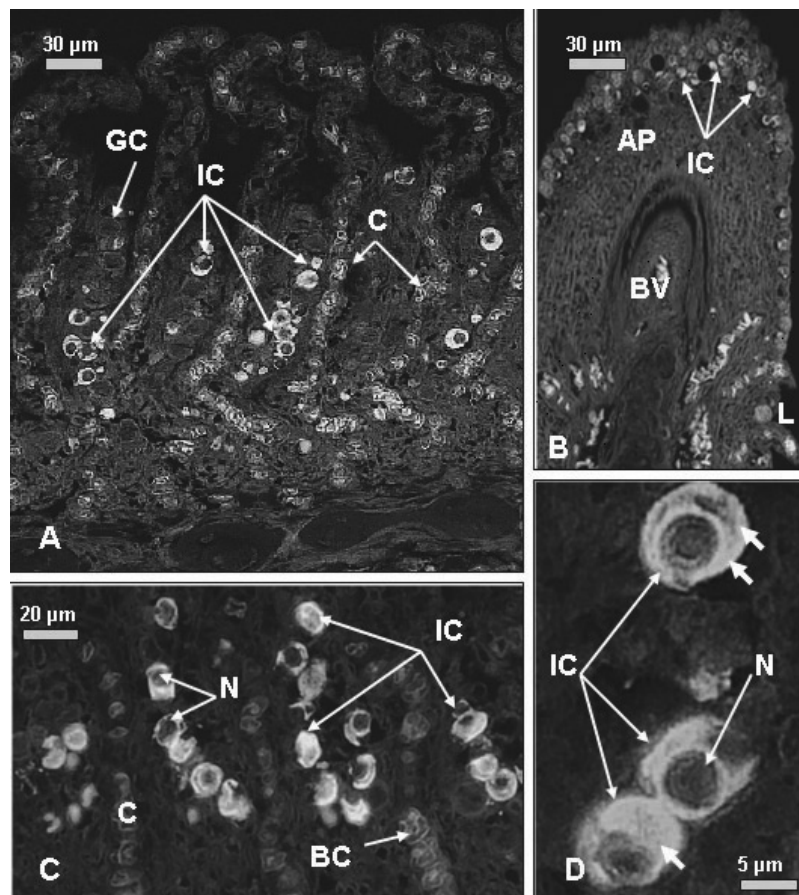
(نمونه رنگی شکل در انتهای مقالات)

سلول ایمنوفلوئورسانسی روی تیغه‌های آبششی دیده نشد ولی تعدادی سلول ایمنوفلوئورسانس در روی رشته‌های آبششی درست در فضاهای بین تیغه‌ای دیده شدند (شکل ۳A). تعدادی از این سلول‌های ایمنوفلوئورسانس در ناحیه راسی رشته‌های آبششی نیز مشاهده شدند (شکل ۳B). در بزرگ‌نمایی بیشتر (×۱۰۰) مشاهده شد که این سلول‌ها، گرد-بیضی و دارای یک هسته درشت در وسط هستند (شکل ۳C و ۳D).

سلول‌های یونوسیت تقریباً به صورت مجتمع دیده می‌شوند و با سلول‌های خونی رنگ‌پذیری کاملاً متفاوتی دارند (شکل ۳C). ایمنوفلوئورسانسی قوی از آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در ناحیه قاعده‌ای-جانبی سلول‌ها مشاهده شد و هسته سلول‌ها هیچ‌گونه ایمنوفلوئورسانسی از خود نشان ندادند (شکل ۳D).

در برش طولی هر رشته، یک محور مرکزی شامل رگ‌های خونی و همچنین دو برش ردیف تیغه‌های آبششی مشاهده می‌شوند (شکل ۱C). تعداد زیادی سلول‌های خونی در داخل رگ‌ها قابل مشاهده است (شکل ۲A، ۲B و ۲C). رشته‌ها و تیغه‌های آبششی توسط بافت پوششی تخصص یافته‌ای پوشیده شده است. این بافت پوششی دارای سلول‌های همراه، سلول‌های موکوسی و سلول‌های یونوسیت است (شکل ۳A). سلول‌های یونوسیت یا کلراید به طور منفرد و گاه چندتایی در بین سایر سلول‌ها جای گرفته‌اند (شکل ۳A).

در روش ایمنوئوهیستوشیمی، آنتی‌بادی $\text{IgG}_{\alpha 5}$ روی آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ قرار گرفته و با حضور آنتی‌بادی دوم این آنزیم را به صورت فلئورسانس نشان می‌دهد. مطالعه ایمنوفلوئورسانس در لام‌های شاهد منفی نشان داد که سلول‌ها هیچ‌گونه فلئورسانسی از خود نشان نمی‌دهند (شکل ۲A، ۲B و ۲C). در سایر لام‌ها، هیچ



شکل ۳: (A) قسمتی از برش طولی رشته و تیغه‌ها. سلول‌های یونوسیت در فضای واقع در بین پایه تیغه‌ها قرار گرفته‌اند. (B) سلول‌های یونوسیت در ناحیه راسی رشته نیز دیده می‌شوند. (C) سلول‌های یونوسیت در ناحیه بین تیغه‌ای به صورت تقریباً مجتمع دیده می‌شوند و با سلول‌های خونی رنگ‌پذیری کاملاً متفاوتی دارند. (D) سلول‌های یونوسیت گرد-بیضی با هسته گرد درشت می‌باشند. ملاحظه می‌شود هسته این سلول‌ها هیچ فلئورسانسی از خود نشان نداده و به رنگ تیره دیده می‌شود.

BV: Blood vessel؛ سلول خونی؛ BC: blood cell؛ سلول خونی؛ AP: Apical part of filament؛ ناحیه راسی رشته آبششی؛ GC: Goblet cell؛ سلول جامی؛ IC: Ionocyte cell؛ سلول یونوسیت؛ C: Capillary؛ مویرگ؛ F: Filament؛ رشته آبششی؛ PC: Pavement cell؛ سلول سنگفرشی؛ L: Lamella؛ تیغه آبششی؛ N: Nucleus؛ هسته سلول؛

(نمونه رنگی شکل در انتهای مقالات)

بحث

ویترز و همکاران نشان دادند که در ماهی قزل آلاهی رنگین کمان، سلول‌های یونوسیت به طور کلی در ناحیه بین تیغه‌های آبششی قرار گرفته‌اند. ضمناً در *Paddlefish (Polydon spathula)* سلول‌های یونوسیت در ناحیه قاعده‌ای تیغه‌های آبششی و همچنین بین تیغه‌ها قرار دارند (۱۱).

نتایج تحقیق شیکانو و فوجیو روی ماهی *Guppy* نشان داده است که در دوره سازگاری این ماهی به آب دریا و آب شیرین، نه تنها تعداد و اندازه سلول‌های یونوسیت بلکه میزان حضور آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در آبشش ماهی نیز برای عملکرد تنظیم یونی ضروری است. در خامه ماهی سلول‌های یونوسیت در مناطق بین تیغه‌ای قرار دارد و به ندرت روی بافت پوششی رشته‌های آبششی مشاهده می‌شوند. در این ماهی، بعد از سازگار شدن به آب شیرین سلول‌های یونوسیت روی تیغه‌های آبششی پدیدار و به فراوانی دیده می‌شوند. در ماهی‌های استوهالین آب شیرین (۲۲) و در ماهی یوری‌هالین سازگاری داده شده به آب شیرین (۳، ۲۳) حضور سلول‌های یونوسیت روی تیغه‌های آبششی نیز گزارش شده است.

همان‌طور که گفته شد در اسبله به عنوان ماهی آب شیرین سلول‌های یونوسیت روی تیغه‌های آبششی حضور ندارند و احتمالاً وجود سلول‌های یونوسیت روی تیغه‌های آبششی ماهیان استخوانی یوری‌هالین سازگاری داده شده به آب شیرین برای کمک به جبران نیاز فیزیولوژیک به یون باشد. گرچه نتایج تحقیقات انجام شده روی سایر ماهی‌ها این مسأله را تایید نمی‌کند (۶، ۲۴).

همچنین نتایج این تحقیق نشان داد سلول‌های یونوسیت آبشش *S. glanis* گرد-بیضی است و آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ به میزان قابل ملاحظه‌ای در قسمت قاعده‌ای-جانبی این سلول‌ها حضور دارد. بنابراین حضور قابل ملاحظه این آنزیم را می‌توان بیان‌گر توانایی هیپواسمولاریتی در گربه ماهی در نظر گرفت. قرار گرفتن آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در قسمت قاعده‌ای-جانبی سلول‌های یونوسیت در نتیجه تحقیقات قبلی نیز آورده شده است (۵، ۲۵).

نتیجه‌گیری

در گربه ماهی *S. glanis* سلول‌های یونوسیت را می‌توان با روش ایمونوهیستوشیمی مکان‌یابی کرد. سلول‌های یونوسیت در ناحیه بین تیغه‌های آبششی و هم‌چنین روی اپی‌تلیال ناحیه رأسی رشته‌های آبششی قرار گرفته‌اند و حضور متراکم آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در ناحیه قاعده‌ای-جانبی این سلول‌ها می‌تواند در نتیجه شرکت فعال آنها در تنظیم فشار اسمزی باشد. لذا می‌توان گفت که توانایی زیست ماهی *S. glanis* در آب شیرین به دلیل حضور یونوسیت‌ها و آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ در آبشش است.

مطالعه بافت‌شناسی آبشش ماهی اسبله نشان می‌دهد که رشته‌های آبششی توسط تیغه‌های آبششی ظریف و نسبتاً کوتاهی پوشیده شده است. فضای اشغال شده توسط تنه اصلی هر رشته نسبت به تیغه‌های آبششی وسیع‌تر است و به عبارتی وسعت بخش تنفسی آبشش خیلی قابل ملاحظه نیست. مطالعات روی ساختار آبشش ماهی‌های مختلف نشان داده است که آبشش در ماهی‌های پرتحرک مثل آزاد ماهیان و تون ماهیان نسبت به ماهی‌های کم‌تحرک و کف‌زی وسیع‌تر است (۱۹). مساحت کل آبشش‌ها بر حسب واحد قراردادی نسبت به گرم وزن بدن در ماهی تن *Mackerel* ۲۵۵۱، در آزاد ماهی دریایی *۱۲۵۳* و در *Toadfish* برابر با ۱۳۷ است (۱۹). لذا با توجه اینکه ماهی اسبله یک ماهی کم‌تحرک و کف‌زی است کم بودن وسعت بخش تنفسی آبشش‌ها یعنی تیغه‌های آبششی قابل توضیح است.

استفاده از آنتی‌بادی IgG_{55} جهت مکان‌یابی آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ و در واقع سلول‌های یونوسیت در حشرات آب‌زی (۱۰)، سخت‌پوستان (۸، ۹، ۱۲، ۱۴، ۱۷، ۲۰) و ماهیان از جمله قزل آلاهی رنگین کمان (۱۳)، باس دریایی (۱۷، ۲۰)، گویی (۲۱)، سالمون چام (۱۶) خامه ماهی (۵) از موفق‌ترین روش‌ها است.

نتایج تحقیق حاضر روی آبشش اسبله ماهی نیز نشان داد این آنتی‌بادی در واکنش با آنزیم $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ ایمونوفلوروسانس قابل ملاحظه‌ای تولید می‌کند و قادر به شناسایی محل حضور آنزیم و به عبارتی محل حضور سلول‌های یونوسیت است.

سلول‌های ایمونوفلوروسانت در قسمت انتهایی (نوک) رشته‌های آبششی و همچنین در ناحیه بین تیغه‌های آبششی ماهی *S. glanis* حضور داشتند و هیچ سلول ایمونوفلوروسانسی روی تیغه‌های آبششی دیده نشد. در برش طولی رشته‌های آبششی مجموعه‌ای از رگ‌های خونی به همراه اریتروسیت‌ها قابل مشاهده است. بیشترین تراکم فلوروسانسی در ناحیه قاعده‌ای-جانبی سلول‌ها بیانگر این امر است که این سلول‌ها در تبادلات فعال یونی شرکت دارند. بر اساس این مشاهدات می‌توان گفت که در ماهی اسبله سلول‌های یونوسیت در بخش انتهایی رشته‌های آبششی و در لابلای بخش پایه‌ای تیغه‌های آبششی واقع شده‌اند. بررسی‌ها روی ماهیان مختلف بیانگر این است که سلول‌های یونوسیت معمولاً روی لبه‌آوران رشته‌ها و در ناحیه بین تیغه‌های آبششی فراوان‌ترند و معمولاً روی بافت پوششی تیغه‌ها یافت نمی‌شوند (۲). هر چند که سازگاری به شرایط محیطی خاص مثل آب‌های شیرین فقیر از نظر یونی کشور برزیل در مورد *Armored catfish (Hypostomus CF. plecostomus)* سبب حضور سلول‌های یونوسیت روی تیغه‌های آبششی جهت بهبود ظرفیت تنظیم یونی آبشش شده است (۴).



References

۱. عبدلی ا، ماهیان آبهای داخلی ایران، انتشارات موزه طبیعت و حیات وحش ایران، ۱۳۷۸، صفحات ۲۶۱-۲۶۰

2. Evans DH, Piermarini PM, Choe KP: The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange,

- osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev* 2005; 85: 97-177
3. Sakamoto T, Uchida K, Yokota S: Regulation of the iontransporting mitochondria-rich cell during adaptation to teleost fishes to different salinities. *Zoological Science* 2001; 18: 1163-1174
 4. Fernandes MN, Perna-Martines SA: Epithelial gill cells in the Armored catfish, *Hypostomus CF. plecostomus* (Loricariidae). *Rev Brasil Biol* 2001; 61(1): 69-78
 5. Karnaky KJ, Kinter LB, Kinter WB, Stirling CE: Teleost chloride cell. II. Autoradiographic localization of gill Na⁺,K⁺-ATPase in Killfish *Fundulus heteroclitus*. *J Cell Biol* 1976; 70: 157-177
 6. Laurent P, Perry SF: Environmental effects on fish gill morphology. *Physiol Zool* 1991; 64: 4-25
 7. Varsamos S, Nebel C, Charmantier G: Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review, *Comparative Biochemistry and Physiology part A* 2005; 141: 401-429
 8. Khodabandeh S, Chamantier G, Blasco C, Grousset E, Chamantier-Daures M: Ontogeny of the antennal gland in the Crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda): anatomical and cell differentiation. *Cell Tissue Res* 2005a ; 319: 153-165
 9. Khodabandeh S, Kutnic M, Aujoulat F, Chamantier G , Chamantier-Daures M: Ontogeny of the antennal gland in the Crayfish *Astacus leptodactylus* (Crustacea, Decapoda):immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase. *Cell Tissue Res*. 2005b; 319: 167-174
 10. Khodabandeh, S: Na⁺,K⁺-ATPase in the gut of the Zygoptera *Ischnura elegans* and Anisoptera *Libellula Lydia* larvae (Odonata): activity and immunocytochemical localization .*Journal of Zoological Studies* 2006; (article in press)
 11. Krayushkina LS, Semenova OG, Panov AA, Gerasimov AA, Ogorzalek A: Reaction of the osmoregulatory system of the Paddlefish *Polyodon spathula* Walb. To marine environment . *Zoologica Poloniae* 2000; 45/1-4: 95-120
 12. Lignot JH, Chamantier-Daures M, Chamantier G: Immunolocalization of Na⁺,K⁺-ATPase in the organs of the branchial cavity of the European lobster *Homarus gammarus* (Crustacea, decapoda). *Cell Tissue Res* 2001; 296: 417-426
 13. Witters H, Berckmans P, Vangenechten C: Immunolocalization of in the gill epithelium of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Cell and Tissue Res* 1996; 283(3): 461-468
 14. Ziegler A: Immunocytochemical localization of Na⁺,K⁺-ATPase in the calcium transporting sternal epithelium of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* L (Crustacean). *J Histochem Cytochem* 1997; 45: 437-446
 15. Reuss L, Wills NK and Lewis, SA: Epithelial Transport Proteins, in Nancy, K., Wills, N. K., Reuss, S. A., L., Lewis, S. A. (Eds), *Epithelial Transport: A Guide to Methods and Experimental Analysis*, Chaman and Hall, 1996, 21- 49
 16. Shikano, T. and Fujio, Y: Immunolocalization of in the branchial epithelium of chum salmon fry during seawater and fresh water acclimation. *Experimental Biology* 1998a; 201: 3031-3040
 17. Nebel C, Negre-Sadargues G, Blasco C, Chamantier G: Morphofunctional ontogeny of the urinary system of the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Anat Embryol* 2005 ; 209: 193-206
 18. Martoja R, Martoja-Pierson M: *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Masson et cie Editeurs , Paris ,1967
 ۱۹. ستاری م، شاهسونی د، شفیعی ش، ماهی شناسی، تشریح و فیزیولوژی، جلد ۱، انتشارات نقش مهر، ۱۳۸۲، صفحات ۱۷۵-۱۶۵
 20. Varsamos S, Diaz JP, Chamantier G, Blasco C, Connes R, Flik G: Location and morphology of chloride cells during the postembryonic development of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* .*Anatomical Embryology* 2002; 205: 203-213
 21. Shikano T, Fujio Y: Relationship of salinity tolerance to immunolocalization of in the gill epithelium during sea water and fresh water adaptation of the Guppy, *Poecilia reticulata*. *Zoological Science* 1998b; 15: 35-41
 22. Lee TH, Hwang PP, Lin HC, Huang FL: Mitochondria-rich cells in the branchial epithelium of the teleost, *Oreochromis mossambicus*, acclimated to various hypotonic environments. *Fish. Physiol. Biochem.* 1996; 15: 513-523
 23. Varsamos S, Wendelaar Bonga SE, Flik G, Quere R, Commes T: Cloning of apiomelanocortin cDNA from the pituitary gland of the sea bass *Dicentrarchus labrax* and assessment of mRNA expression in different tissues by means of real-time PCR. *J Endocrinol* 2003; 176: 405-414
 24. Lin HC, Sung WT: The distribution of mitochondria-rich cells in the gills of air-breathing fishes. *Physiol. Biochem. Zool* 2003; 76: 215-228

25. Hootman SR, Philpott CW: Ultracytochemical localization of Na,K-activated ATPase in chloride cells from the gills of a euryhaline teleost. Anat Rec 1979; 193: 99-130

